

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Matěj Drs

Autofagie v obraně rostlin před patogeny
Autophagy in plants defence against pathogenes

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Viktor Žárský, CSc.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 17.8.2016

Podpis

Velmi děkuji svému školiteli doc. RNDr. Viktorovi Žárskému, CSc. za ochotu, trpělivost a cenné rady.

Abstrakt

Autofagie je degradační proces, umožňující buňce, zbavit se nežádoucích částí cytoplazmy jejím izolováním dvojitou plazmatickou membránou a následným transportem do vakuoly. Ve stresových situacích zvláště při hladovění je autofagická aktivita nejvyšší. A takovouto situací může být i napadení patogenem. Rostlinný imunitní systém disponuje řadou procesů, kterými se brání proti infekci. Jedním z hlavních obranných mechanismů je programovaná buněčná smrt (PCD). V rostlinné buňce může být PCD spuštěna různými signálními drahami. Imunitní systém zahrnuje specifický typ PCD známý jako hypersensitivní reakce (HR), která je efektivní v obraně proti biotrofním patogenům. HR je spojena se signalizací závislou na kyselině salicylové (SA) a pozitivně i negativně modulována procesem autofagie. Nicméně autofagie je zapojena i do dalších signalizačních drah. Nekrotrofní patogeny často využívají fytotoxinů k aktivnímu usmrcení hostitelské buňky. Autofagie se patrně účastní i degradace těchto fytotoxinů. Důležitou roli hraje i během signalizace závislé na kyselině jasmonové (JA) a ethylenu (ET). Tyto signalizační dráhy obvykle spouštějí reakce proti nekrotrofním patogenům a utlumují signalizaci závislou na SA. Autofagie v tomto případě pravděpodobně zabraňuje iniciaci PCD spojené právě s SA. V neposlední řadě je autofagie důležitým faktorem v obraně proti virům, kde se podílí na degradaci „RNA silencing suppressorů“ (RSS) produkovaných viry. Tato práce shrnuje poznatky o roli autofagie v obraně rostlin před různými typy patogenů

Klíčová slova:

Autofagie, rostlinný imunitní systém, hypersensitivní reakce, kyselina salicylová , kyselina jasmonová, biotrofní patogeny, nekrotrofní patogeny

Abstract

Autophagy is a degradation process allowing the cell to get rid of unwanted parts of cytoplasm by isolating into double layer plasma membrane and subsequent transport into vacuoles. In stressful situations especially at starvation the autophagy activity is highest. And such situation can also be infecting by pathogen. The plant immune system has a number of processes which prevents infection. One of the main defensive mechanisms is programmed cell death (PCD). In plant cell, the PCD may be running by different signal pathways. Immune system includes a specific type of PCD known as hypersensitive reaction (HR), which is an effective defense against pathogens. HR is associated with salicylic acid-dependent signaling (SA) and this pathway is positively and negatively modulated by the process of autophagy. However, the autophagy is involved in other signaling pathways. Necrotrophic pathogens often use phytochemicals to actively kill the host cell. Autophagy probably also participates in the degradation of these phytochemicals. It also plays an important role during signaling dependent on the jasmonic acid (JA) and ethylene (ET). These signaling pathways usually trigger the reactions against necrotrophic pathogens and suppress signal dependent on SA. Autophagy in this case may be preventing the initiation of PCD.

Last but not least, autophagy is an important factor in the defense against viruses, where it participates in the degradation of RNA silencing suppressors (RSS) produced by viruses. This thesis summarizes the findings about the role of autophagy in the defense of plants against different types of pathogens.

Keywords:

Autophagy, plant immune system, hypersensitive reaction, salicylic acid, jasmonic acid, biotrophic pathogens, necrotrophic pathogens

Seznam použitých zkratk:

AGO (x) – argonaut protein (součást RISC)

ATG (x) – gen- autophagy/ autofagický gen

Avr(xy) – Avirulentní gen

BECLIN1 – homolog Atg6 u *A. thaliana*

CC-NB-LRR – coiled coil-nucleotid binding-leucin rich repeat receptor

DIR1 – dirigent protein 1

dsRNA – dvouvláková RNA

EDS1 – enhanced disease susceptibility 1/ zvýšená citlivost k nemoci 1

ET – ethylen

ETI – effector triggered immunity/ efektoem spuštěná imunita

ETS – effector-triggered susceptibility/ efektoem vyvolaná citlivost

HC-Pro – helper component proteinase/ pomocný komponent proteinázy

Hop1 – virulenční efektor *P. syringae*

ICS1 – isochorismát syntáza 1

GADPH – glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza

JA – jasmonic acid/ kyselina jasmonová

MAMP – microbial-associated molecular patterns/ s mikrobem spojené molekulární vzory

MAPK4 – mitogen-activated protein kinase 4/ mitogenem aktivovaná protein-kináza 4

NahG- salicylate hydroxylase/ hydroxyláza kyseliny salicylové

NB-LRR – nucleotide binding (NB) leucine rich repeat (LRR)/ nukleotid vázající - na leucin bohaté opakování

NDR1 – non-race specific disease 1/ ne-rasově specifická nákaza 1

NO – oxid dusnatý

NPR1 – non expressor of PR genes 1/ ne-spouštěč PR genů 1

OA – oxalic acid/ kyselina šťavelová

P0 – RSS protein virů

PAD(x) – Protein phytoalexin deficient 4/ fytoalexin deficientní protein 4

PAMP – pathogen-associated molecular patterns/ s patogenem spojené molekulární vzory

PCD – programovaná buněčná smrt

PDF1.2 – plant defensin 1.2/ rostlinný defensin 1.2

PI3k – fosfatidylinositol 3 kináza

PR-(x) gen – pathogen-related/ s patogenem související gen

PRR – pattern recognition receptor/ vzor rozpoznávající receptor

PTI – PAMP triggered immunity/ PAMP spuštěná imunita

R-geny – rezistenční geny

rgs-CaM – tabákový calmodulin-like protein

RISC – RNA-induced silencing complex/ RNA-indukovaný umlčovací komplex

RNAi – RNA interference

ROS – reactive oxygen species/ reaktivní formy kyslíku

RPM1 – disease resistance protein 1/ nákaze rezistentní protein 1

RPS4 – disease resistance protein 4/ nákaze rezistentní protein 4

RSS – RNA silencing suppressor/ potlačovač RNA umlčení

SA – salicylic acid/ kyselina salicylová

SAR – systemic acquired resistance/ systémová získaná rezistence

SFD1 – suppressor of fatty acid desaturase deficiency/ potlačovač nedostatku desaturázy masných kyselin.

SID2 – salicylic acid induction-deficient 2/ nedostatečný induktor kyseliny salicylové

TIR-NB-LRR – Toll/Interleukin1-NB-LRR

TMV – virus tabákové mozaiky

TMV-p50 – efektor viru tabákové mozaiky

VPS34 – vacuolar protein sorting 34/ vakuolární řadič proteinů 34

WRKY(x) – transkripční faktor

Y2b – RSS protein viru okurkové mosaiky

Obsah

1.Úvod.....	1
2.Imunitní systém rostlin.....	2
2.1 Rozpoznání MAMPs a PTI reakce.....	2
2.2 Geny rezistence a ETI reakce.....	3
2.3 Princip obrany před biotrofními patogeny.....	5
2.4 Princip obrany před nekrotrófními patogeny.....	6
3.Autofagie a její role v obraně před patogeny.....	8
3.1 Autofagie v obraně před biotrofními patogeny.....	10
3.1.1 PCD a indukce autofagie je závislá na typu avirulentích genů.....	12
3.2 Role autofagie v SA signální dráze.....	13
3.2.1 Role autofagie během RNA-interference způsobené virovou infekcí.....	16
3.3 Autofagie v obraně před nekrotrófními organismy.....	17
3.4 Role autofagie v koordinaci SA a JA/ET signálních drah.....	19
4.Závěr.....	20
Seznam použité literatury.....	21

1. Úvod

Autofagie, fenomén který je pozorovatelný napříč celou eukaryotní říší, se v buňkách účastní mnoha základních procesů absolutně nezbytných pro přežití. Je důležitou degradační cestou, jak se zbavovat nejen proteinů, ale i celých organel a velmi úzce spolupracuje s lysozomy u živočichů nebo s vakuolami u rostlin, zodpovědnými za finální rozložení proteinů a jiných molekul. V poslední době byla autofagie podrobena intenzivnímu výzkumu, který odhalil nové poznatky o roli autofagických procesů v buňce. Mimo jiné se ukazuje, že autofagie je často esenciálním faktorem v průběhu imunitních reakcí jak u živočichů, tak i u rostlin. V případě jejího defektu vykazují organismy obvykle značné metabolické změny vedoucí nezřídka i k smrti celého organismu. Tato práce shrnuje poznatky o úloze autofagie v imunitních odpovědích na různé typy patogenů a rovněž její dopad na signalizaci spojenou s jednotlivými druhy nákazy u rostlin.

Při odpovědi na infekci se často autofagické procesy účastní jak pochodů restriktivních, tak i pochodů opačného charakteru. Její indukce je spojená s množstvím signalizačních drah aktivujících rozličnou škálu typů imunitních odpovědí. Rostliny ve svém životě neustále čelí útoku patogenů a jakožto přisedlé organismy, nemohou před nákazou utéci, musely tak během svého evolučního vývoje vytvořit sérii mechanismů, jak se proti nákaze účinně bránit na místě napadení.

Pro dobré pochopení, jak je autofagie zakomponována do imunity rostlin, považuji za nezbytné ve své práci nastínit základní signalizační dráhy a princip rostlinného imunitního systému.

2. Imunitní systém rostlin

Jako každý organismus, může být i rostlina cílem útoku patogenu. Na rozdíl od živočichů, rostliny nemají specializované imunitní buňky jako jsou lymfocyty nebo makrofágy či ústrojí, kde by probíhala selektivní tvorba protilátek. Ovšem na straně druhé, není pro patogenní organismy zdaleka jednoduché rostliny napadnout. V jejich těle nenajdeme žádné sliznice, které jsou u savců branou, mnohdy využívanou chorobami, pro vstup do organismu. Povrch rostlin je často kryt odolnou voskovou kutikulou, vodivá pletiva xylému jsou tvořena odumřelými buňkami a i obyčejné buňky mají buněčnou stěnu, která je taktéž nedílnou součástí pasivní obrany. Díky těmto bariérám může dojít k infekci pouze v případě mechanického poranění pletiv, přenosu vektorem, nebo proniknutím průduchy. Výjimku tvoří houby, které jsou schopny narušit voskovou kutikulu a prorůst skrze pokožku.

2.1 Rozpoznání MAMPs a PTI reakce

Imunitní systém rostlin lze rozdělit na dvě vrstvy. První obrannou linii tvoří extracelulární transmembránové receptory PRRs (pattern recognition receptors), které jsou schopny rozpoznat přítomnost potenciálně patogenních organismů podle jejich specifických molekul tzv. PAMPs/MAMPs (pathogen/microbial-associated molecular patterns). Tyto PAMPs jsou velice často součástí buněčné struktury, která je evolučně fixována a specifická pro určitý organismus. Typickým příkladem může být flagelin (stavební molekula bakteriálního bičíku) nebo chitin (stavební bílkovina buněčných stěn hub). Pokud dojde k rozpoznání MAMPs, zahájí rostlinný organismus imunitní odpověď (Jones & Dangl 2006, review). V buňkách dochází k ukládání kalózy do buněčných stěn, uzavření stomat, syntéze antimikrobiálních látek a sekundárních metabolitů, převážně však k produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Pro značnou část prokaryotických organismů má působení ROS fatální následky a obvykle končí jejich smrtí. (Hammond-Kosack & Jones 1996, review; Doke & Ohashi 1988) Tento typ obrany se nazývá PTI (PAMP spuštěná imunita).

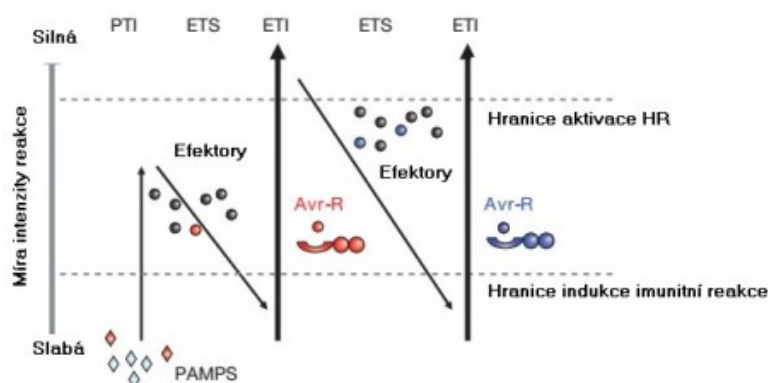
Mnoho patogenů je ovšem schopno zamezit rozpoznání svých MAMPs vypuštěním efektorů do buňky. Efektory jsou povětšinou bílkoviny, přerušující signalizační kaskádu zprostředkovanou PRRs a tedy umožňující proniknutí do organismu hostitele (Jones & Dangl 2006, review).

2.2 Geny rezistence a ETI reakce

Rostliny v průběhu evolučního boje s patogeny získaly rezistenční geny (R geny), tyto geny kódují mimo jiné specifické proteiny tzv. NB-LRR (nukleotid binding-leucin rich repeat receptor) receptory. Skládají se ze dvou hlavních domén, NB je doména vázající nukleotid a LRR zajišťuje specifitu k příslušnému efektoru. Na rozdíl od PRRs jsou NB-LRR receptory lokalizované v cytoplazmě buňky, dokáží monitorovat přítomnost příslušného efektoru a následně zahájit obranné mechanismy. Rozpoznání efektoru NB-LRR receptorem je spíše nepřímého charakteru. NB-LRR receptory jsou schopné detekovat změny vzniklé v důsledku působení efektoru, než se přímo vázat na příslušný efektor (Jones & Dangl 2006, review). Patogeny samozřejmě vytvářejí stále nové efekторы a rostliny jsou nuceny odpovídat na tento selekční tlak tvorbou nových NB-LRR proteinů. Tento fenomén vešel do vědeckého povědomí jako hypotéza „gen proti genu“¹ (Flor, 1971). Patogenní organismy disponující genem efektoru, proti kterému rostlina vlastní příslušný R gen, se označují jako avirulentní. Dokáží překonat obranu závislou na PRR a proniknout do hostitelské buňky, ale již nejsou schopny způsobit infekci a dokončit tak svůj životní cyklus (Dangl & Jones 2001, review).

Imunitní reakce iniciovaná efekty patogenů se nazývá efektem spuštěná imunita (ETI). Aktivace ETI je velmi často doprovázena hypersenzitivní reakcí (HR), což je typ programované buněčné smrti (PCD) s vysokou mírou kontroly. Hlavními účinnými látkami jsou opět kyslíkové radikály, ovšem jejich produkce je mnohonásobně masivnější než u PTI reakce (Jones & Dangl 2006, review), nicméně i zde se uplatňují specializované antimikrobiální látky jako jsou fytoalexiny, nebo jiné sekundární metabolity (Thomma et al., 1998). Princip boje hostitele s patogenem byl v tomto případě nazván jako „Zik-Zak“ model (Jones & Dangl 2006, review) (Obr.1).

1 Anglicky „gen for gen“



Obr. 1 Zik-Zak model. Ze schématu je patrný průběh celé imunitní reakce. ETS zde představuje zvýšenou citlivost k patogenu v důsledku působení efektoru a Avr-R je interakcí mezi efektem a rostlinným receptorem NB-LRR (Jones & Dangl, 2006, review)

Nedílnou součástí rostlinných imunitních reakcí je i hormonální signalizace spojená s třemi hlavními hormony:

- kyselinou salicylovou (SA)
- kyselinou jasmonovou (JA)
- Ethylenem (ET).

Jedná se o velice komplikované signalizační kaskády a doposud ne zcela kompletně objasněné (Glazebrook 2005, review; Klessig et al. 2000; Glazebrook et al. 1997).

Rostlina může být napadena dvojím typem patogenního organismu, biotrofním nebo nekrotrofním. Existují však i patogeny kombinující oba typy, označují se jako hemi-biotrofní. Tyto skupiny se od sebe liší životní strategií.

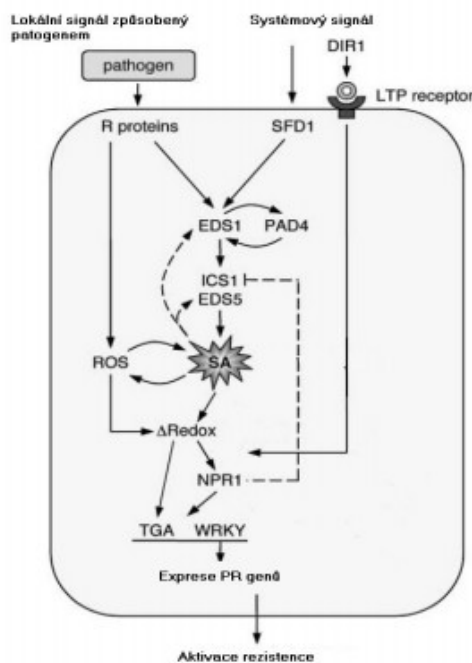
Biotrofové využívají živé hostitelské buňky, ze kterých čerpají živiny nebo potřebují jejich replikační a translační aparát pro dokončení svého životního cyklu. Nekrotrofní organismy hostitelské buňky zabíjejí a z mrtvých tkání následně extrahují živiny. Hemi-biotrofové se při infekci zprvu chovají jako biotrofní patogeny, ovšem v pozdější fázi vykazují charakter nekrotrofní a usmrcují hostitelské buňky. Je tedy nasnadě, že se průběh imunitní reakce bude zásadně lišit (Klessig et al. 2000; Glazebrook et al. 1997; Jones & Dangl 2006, review).

2.3 Princip obrany před biotrofními patogeny

Interakce mezi biotrofním patogenem a hostitelem je obvykle velice specifická. Snahou patogenu je infikovat hostitele a nebýt přitom rozpoznán žádným z obranných receptorů. Právě zde se uplatňuje Florova hypotéza „gen proti genu“ (Flor, 1971) a tedy interakce efektorů a NB-LRR. Nejčastější reakcí na infekci biotrofem je u rostlin HR. Patogen je následně izolován v poli nekrotické tkáně tím zpravidla usmrčen (z mrtvých buněk již není schopen získat potřebné látky k životu) (Hofius et al., 2009). Biotrofními patogeny jsou například všechny viry, jelikož nemají vlastní replikační, transkripční ani translační aparát.

Důležitým mediátorem pro zahájení systémové imunitní reakce je v tomto případě kyselina salicylová (SA), jejíž intenzivní syntéza se spouští poplašnými/varovnými signálními molekulami jako jsou ROS, které se uvolňují v důsledku interakce s patogenem (Obr.2). Signalizace prostřednictvím SA následně aktivuje příslušné transkripční faktory a přepis PR genů (Yalpani, 1991). Výsledkem tohoto procesu je SAR (systémová získaná rezistence), která ovlivňuje metabolismus celé rostliny a zvyšuje resistenci vůči dalším infekčním agens (Glazebrook et al., 2003; Klessig et al., 2000; Uknes et al., 1992).

Obr. 2 Zjednodušený model aktivace SA signalizace. Syntéza SA je ovlivněna několika drahami. Skrze NB-LRR receptory (R proteiny), SFD1 (účastní se metabolismu lipidů (Nandi et al., 2004) je rovněž schopný aktivovat SA, třetí možnost aktivace zastupuje DIR1 (transferový protein účastnící se signalizace na dlouhou vzdálenost (Maldonado et al., 2002)). Jeho cílem není přímo SA, nicméně je také iniciátorem signální dráhy pro navození rezistence. ICS1 se podílí na samotné syntéze SA a může být inhibován NPR1 (konkrétní mechanismus je neznámý). Důležitým spouštěčem SA je ROS a EDS1. SA tvoří autoregulační smyčku při interakci s těmito faktory (Durrant & Dong, 2004, review) Celá signalizace je ovšem ve skutečnosti mnohem složitější. Převzato a upraveno z (Durrant & Dong, 2004, review)

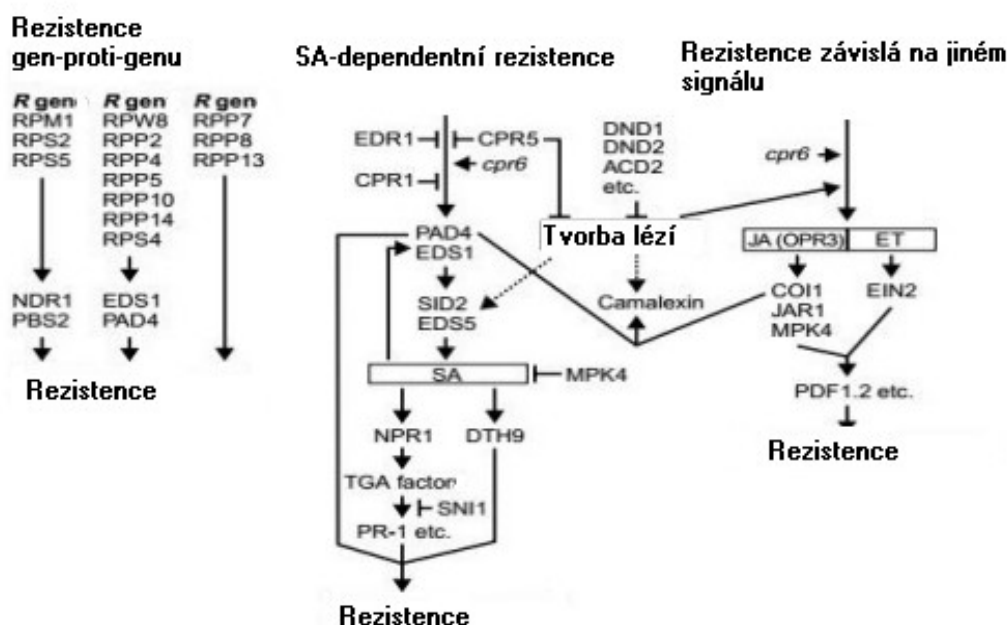


2.4 Princip obrany před nekrotrofními patogeny

Infekce organismy nekrotrofního charakteru představuje pro rostlinu obvykle větší problém než v předchozím případě. Většina nekrotrofních patogenů disponuje baterií rozličných proteolytických enzymů a fytotoxických látek schopných usmrtit hostitelskou buňku. Imunitní odpověď je v tomto případě spojená s JA a ET signalizační kaskádou (Glazebrook 2005, review). Produkty těchto drah jsou typicky různé fytoalexiny (camalexin závislý na funkci genu *PAD3*) a některé další druhy antimikrobiálních látek (defensiny *PDF1.2* gen, chitinázy *PR-3* gen) (Thomma et al., 1998). Iniciace JA a ET signalizace bývá zprostředkována rozpoznáním chitinových PAMPs, narušením povrchu buňky, inhibicí syntézy celulózy, ale i mnoha dalšími faktory (Ellis et al., 2002). Hlavním regulátorem imunitní reakce indukované prostřednictvím JA signalizace je gen *COI1*. Pokud je tento gen umlčen, často dochází k masivní redukci obranných mechanismů, které rostliny divokého-typu jinak obvykle vykazují (Thomma et al., 1998). Některé nekrotrofní organismy disponují geny, umožňující obrátit obranné procesy hostitele proti němu samému, a ve svůj prospěch. Takovýmto parazitem je například *Botrytis cinerea*, jenž dokáže spustit u hostitele HR (Govrin & Levine, 2000).

Propojení signalizace mezi JA a ET je značně provázané (Obr.3), často jsou pro iniciaci příslušné odpovědi nezbytné obě tyto cesty, nicméně v některých případech působí navzájem antagonisticky a existují rovněž i imunitní reakce zprostředkované pouze jedním z nich (Bohman et al., 2004). Ve srovnání s obranou proti biotrofům je odpověď na nekrotrofní typ nákazy o mnoho komplexnější a obvykle zahrnuje vyšší množství různých genů souvisejících s inhibicí nebo destrukcí parazita. Pro tyto interakce nebyla pozorována imunitní odpověď typu „gen proti genu“ (Glazebrook 2005, review; Penninckx et al. 1998; Govrin and Levine 2002). Další komplikací je závislost signalizace mezi JA & ET na jedné a SA na druhé straně. Účinek těchto signalizačních drah je většinou navzájem antagonistický, čehož s oblibou patogeny využívají (Lai et al, 2011).

Jelikož existují případy, kdy jsou souběžně aktivovány všechny tyto tři typy signalizace, je výzkum, sledující výsledek vybrané kaskády, velmi obtížný a konkrétní funkce všech účastníků se genů není doposud zcela objasněna (Glazebrook et al. 2003; Ferrari et al. 2003). Souhrn regulace a propojení SA, JA a ET je znázorněn na Obr. 3.



Obr 3 Schéma propojení signalizací závislých na SA, JA a ET indukujících rezistenci.

Schéma obsahuje i model imunitní reakce typu gen proti genu. Převzato a upraveno z (Glazebrook, 2001, review) (Schéma rovněž zahrnuje geny, které se dále v této práci vůbec neobjevují. Považuji však za přínosné ponechat obrázek více neupraven, pro ilustraci komplexnosti tohoto signalizačního systému.)

3. Autofagie a její role v obraně před patogeny

Autofagie je starý evolučně konzervovaný proces společný většině eukaryotních organismů. Uplatňuje se v široké škále buněčných pochodů jako je degradace odpadních látek a poškozených organel v lysozomech či vakuolách, udržování homeostáze, odpověď na hladovění až po samotný vývoj a diferenciaci buněk. V posledních letech se prokázalo, že autofagické procesy hrají důležitou roli i v imunitních reakcích. Autofagie může být selektivní či neselektivní a lze ji rozdělit na několik typů. (Yang & Bassham, 2015) Například:

- Makroautofagii
- Microautofagii
- Chlorofagii
- Mitofagii
- Pexofagii
- Chaperony zprostředkovanou autofagii

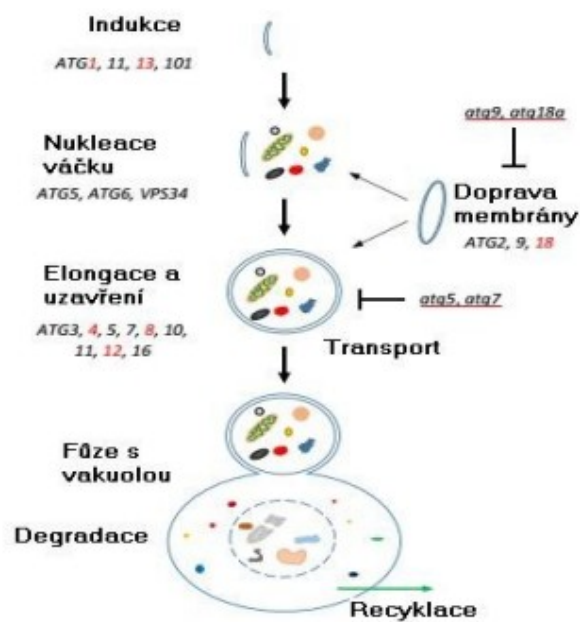
Mikrofagie je v podstatě invaginace tonoplastu vakuoly nebo membrány lysozomu. Chlorofagie, pexofagie a mitofagie je proces odstraňování částí nebo celých organel tj. chloroplastů, peroxisomů a mitochondrií (Yang & Bassham 2015, review). Tento druh autofagie je pravděpodobně důležitým mechanismem restrikce signálu pro spuštění PCD (Lai et al., 2011). Chaperonem indukovaná autofagie je zvláštním typem, jelikož pro její funkci není potřeba vezikulární transport, ale příslušný protein je uzavřen v chaperonu a následně dopraven do lysozomu (Tanida, 2011, review). Nejčastěji se však pod pojmem autofagie skrývá makroautofagie a je také nejvíce probádaným typem. Základním prvkem makroautofagie (dále už jen autofagie) je formace tzv. autofagosomu tj. váčku tvořeného dvojitou plasmatickou membránou (Obr.4) (Yang & Bassham 2015, review). U kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* bylo objeveno mnoho (cca30) genů (ATG-geny) (Hanaoka 2002) (Obr.5) podílejících se na samotném procesu autofagie, nukleaci a řízení autofagosomů. Mnohé z nich mají své orthology a homology i v rostlinném genomu (Obr.5) (Yoshimoto et al., 2009). Biogeneze autofagosomu probíhá v několika fázích (Obr.4), jednotlivé kroky vyžadují expresi specifických skupin genů, které se od sebe odlišují svou funkcí (Obr.4) (Yang & Bassham 2015, review):

- Fosfatidylinositol 3-kinázový komplex (PI3k)
- ATG9 cyklický systém
- Dvě „ubiquitin-like“ conjugační dráhy

Rostliny mající defekt v některé z těchto tří genových skupin, obvykle nejsou schopny dokončit kompletní průběh autofagického procesu (Yang & Bassham 2015, review).

Na autofagii závisí značná část životně důležitých procesů, proto je výzkum (obvykle prováděný cíleným vypnutím či umlčením požadovaného genu modelových organismů) velmi nesnadný a přesný průběh autofagie v některých reakcích doposud nebyl neodhalen (Yoshimoto et al., 2009).

Obr. 4 Biogeneze autofagosomu. Jednotlivé fáze formování jsou doprovázeny expresí příslušných skupin ATG genů, přičemž červeně podtržené geny značí fatální mutace a tedy inhibici odpovídající fáze. Genová skupina dvou „ubiquitin-like“ konjugačních drah se účastní zejména iniciační a elongační fáze. ATG9 cyklický systém je spojen s dopravou membrán. PI3K se podílí na nukleaci, ale doprovází i jiné kroky formace autofagosomu. Převzato a upraveno z (Yang & Bassham, 2015, review)



<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i>
Atg1	AtATG1a, AtATG1b, AtATG1c
Atg2	AtATG2 ^a
Atg3	AtATG3
Atg4	AtATG4a ^a , AtATG4b ^a
Atg5	AtATG5 ^a
Atg6	AtATG6 ^a
Atg7	AtATG7 ^a
Atg8	AtATG8a, AtATG8b, AtATG8c, AtATG8d, AtATG8e, AtATG8f, AtATG8g, AtATG8h ^b , AtATG8i ^b
Atg9	AtATG9 ^a
Atg10	AtATG10 ^a
Atg12	AtATG12a, AtATG12b
Atg13	AtATG13a, AtATG13b
Atg14	Not identified
Atg16	AtATG16L ^c
Atg17	Not identified
Atg18	AtATG18a ^a , AtATG18b, AtATG18c, AtATG18d, AtATG18e, AtATG18f, AtATG18g, AtATG18h
Atg29	Not identified
Atg31	Not identified

Obr. 5 Seznam Atg genů u kvasinky *S. cerevisiae* a homologních genů *A. thaliana*.
Převzato z (Yoshimoto et al., 2009)

3.1 Autofagie v obraně před biotrofními patogeny

Jak už bylo popsáno výše, typickým projevem při infekci biotrofem je HR odpověď a následné spuštění SAR SA-signalizační dráhou. Velmi zajímavé je v tomto případě zapojení ATG genů. Přelomová studie provedená na rostlinném modelu *Nicotiana benthamiana* prokázala, že umlčením genu *BECLIN1* (gen *ATG6* u *A. thaliana*) v rostlinách infikovaných virem TMV není HR odpověď omezena pouze na místo infekce (Liu et al. 2005). Z tohoto důvodu je možné pozorovat tvorbu nekrotické tkáně dříve a dokonce i v pletivech vzdálených od epicentra nákazy, ve kterých se virus ani nenachází. Toto fatální selhání restrikce HR může být způsobeno i pouhým rozpoznáním virového efektoru TMV-p50 rostlinným N-proteinem (Liu et al., 2005). Následná destrukce zdravých tkání je *de facto* už projev systémové odpovědi a přítomnost viru samotného tedy není pro iniciaci HR nezbytná (Liu et al., 2005). U rostlin divokého-typu je HR striktně omezena na místa inokulace. Během infekce TMV či pouze aplikací TMV-p50, dochází k tvorbě a akumulaci autofagosomálních váčků. (Liu et al., 2005). Kompletní obsah autofagosomů není doposud znám, je však velice pravděpodobné, že obsahují oxidované proteiny vzniklé v důsledku působení ROS (Liu et al., 2005), patrně však také látky zapojující se během SA signalizace a indukce SAR (Xiong et al., 2007). Lze tedy předpokládat, že autofagie negativně reguluje signál pro spuštění HR. Obdobné fenotypové projevy, lze pozorovat i v případě rostlin umlčených v těchto autofagických genech *PI3K/VPS34* (fosfatidylinositol 3-kináza/vakuolární protein-třídící

bílkovina 34), *ATG3* a *ATG7*, následně vystavených působení TMV (Liu et al., 2005). Podobně orientovaná studie provedená na genetickém modelu *Arabidopsis thaliana* (s umlčeným *ATG6* genem) a na bakteriálním patogenu *Pseudomonas syringae* (Patel & Dinesh-Kumar, 2008), přináší výsledky srovnatelné s výzkumem interakce TMV a *Nicotiana benthamiana* (Liu et al., 2005). Rostliny s mutací *atg6* nedokáží omezit průběh HR pouze na místo, kde se nákaza vyskytuje (Patel & Dinesh-Kumar, 2008).

Další klíčové *ATG* geny účastníci se imunitních reakcí, jsou již zmíněný *ATG7*, *ATG9* a *ATG6* (Hofius et al., 2009; Patel & Dinesh-Kumar, 2008). Imunitní reakce při infekci *Arabidopsis thaliana* avirulentním kmenem bakterie *Pseudomonas syringae* pv. tomato (*Pto*) DC3000 je vázaná na signalizaci v hostiteli zprostředkovanou NB-LRR receptory. Tento kmen bakterie může nést dva typy efektorů (genů avirulence) *AvrRps4* nebo *AvrRpm1*. První gen je rozpoznáván rostlinným NB-LRR z rodiny TIR-NB-LRR (Toll/Interleukin1-NB-LRR) a kódovaný rostlinným *RPS4* genem, zatímco druhý je rozpoznáván CC-NB-LRR (coiled coil-NB-LRR) z genové třídy *RPM1* (Hofius et al., 2009). Ačkoliv je *P. syringae* hemi-biotrofní organismus, na počátku infekce se chová jako biotrof a proto rostlina zahajuje příslušnou reakci tedy HR (Glazebrook 2005, review). Průběh této interakce mezi hostilem *A. thaliana* mající *atg7* či *atg9* mutaci s *P. syringae* *AvrRpt4* či *AvrRpm1* (Hofius et al., 2009) je částečně odlišný od předchozích experimentů (Liu et al., 2005; Patel & Dinesh-Kumar, 2008). Společným prvkem je snížená až zastavená schopnost tvorby autofagosomů. Avšak tyto rostliny (*atg7* nebo *atg9*) téměř nevykazují PCD indukovanou HR, která je ovšem standardním projevem u divokého-typu (Hofius et al., 2009; Liu et al., 2005; Patel & Dinesh-Kumar, 2008). Výsledky tedy naznačují, že geny *ATG7* a *ATG9* patrně nejsou nezbytnou součástí kontroly PCD spuštěné HR při napadení avirulentním kmenem *P. syringae*. Tuto hypotézu podporuje i výsledek inokulace pokusných *atg7* nebo *atg9* rostlin avirulentním typem Noco2 *Hyaloperonospora arabidopsidis* (oomyceta). I v tomto případě reagují mutantní jedinci potlačením HR, zatímco projev kontrolních rostlin je doprovázen tvorbou lézí (Hofius et al., 2009). Zarážejícím faktem je také neschopnost omezit růst bakterie *P. syringae* v počáteční fázi průběhu infekce. Množství bakterií mnohokrát převyšuje stav zaznamenaný u divokého-typu. Rozdíl je ale v pozdějším stádiu zpětně redukován na běžnou úroveň vykazovanou nemutantními rostlinami (Hofius et al., 2009; Liu et al., 2005). Tento fenomén je společný pro všechny tři zmíněné studie z čehož vyplývá, že autofagie se zásadním způsobem podílí na restrikci množení a růstu jak virových, bakteriálních, tak i houbových parazitických organismů, alespoň v počátečních fázích nákazy. (Hofius et al., 2009; Liu et al., 2005).

Rozdílnost fenotypových odchylek vlivu autofagie na restrikci HR je patrně v aktivaci

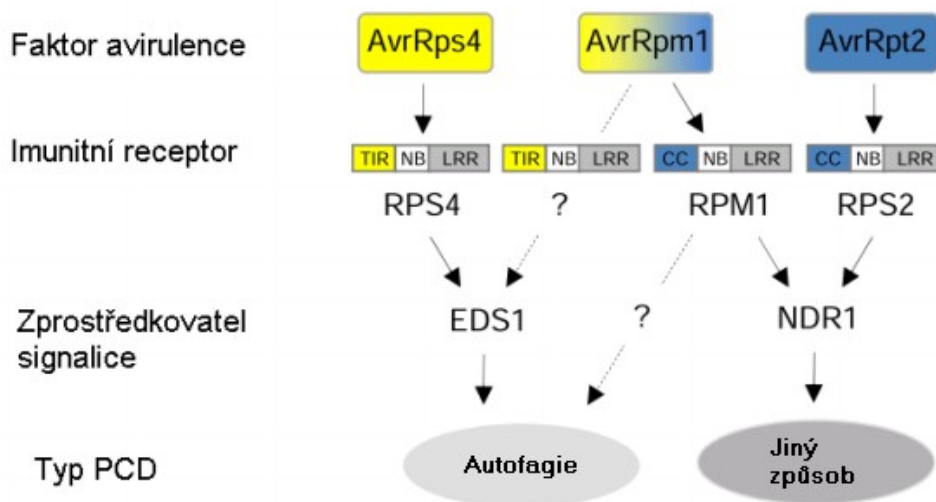
jiných signálních drah zprostředkovaných různými typy NB-LRR proteinů. Pro indukci rezistence prostřednictvím SA byly popsány tři důležité signální dráhy vázané na tři různé geny *EDS1*, *NDR1* a *PAD4* (Obr.2) Tyto dráhy mají odlišný průběh a také spouštějí transkripci jiných specifických genů (Aarts et al., 1998).

3.1.1 PCD a indukce autofagie je závislá na typu avirulentních genů

Při naočkování *A. thaliana* s mutací v genu *atg7* či *atg9* avirulentním kmenem *Pseudomonas syringae* *AvrRps4* (Hofius et al., 2009), je tento efektor (*AvrRps4*) rozeznáván receptorem kódovaným genem *RPS4* tj. TIR-NB-LRR receptor, který je funkčně spojen s indukcí *EDS1*-dependentní PCD (Aarts et al., 1998) Fenotypem interakce hostitele s patogenem je v tomto případě u divokého-typu rostlin tvorba lézí, tedy spuštění PCD při HR odpovědi. Tento projev je zároveň doprovázen vytvářením autofagických váčků uvnitř buněk, u *atg7* nebo *atg9* mutantů je PCD silně potlačena a k indukci autofagie a odumírání pletiva téměř nedochází (Hofius et al., 2009). Avirulentní gen *Noco2* oomycety *Hyaloperonospora arabidopsidis* je taktéž rozeznáván hostitelským TIR-NB-LRR a aktivuje PCD skrze *EDS1* (Hofius et al., 2009; Parker et al., 1996). Výsledek této interakce je totožný s infekcí *A. thaliana atg7*, *atg9* a kontrolní rostliny s *P. syringae AvrRps4* (viz výše). Autofagie je tedy dozajista nezbytná pro bezchybný průběh PCD indukované skrze *EDS1* (Hofius et al., 2009)

PCD odvíjející se od signalizace prostřednictvím genu *NDR1* (Obr.5) je obecně indukována receptorovými proteiny CC-NB-LRR. Mezi geny kódující tyto proteiny patří *RPM1*, *RPS2* (Aarts et al., 1998; Century et al., 1995). Příslušné avirulentní geny *P. syringae* jsou tedy *AvrRpm1* a *AvrRpt2*. V imunitní reakci *A. thaliana* s defektem pro *atg7* či *atg9* proti *P. syringae AvrRpt2* není PCD doprovázena indukcí autofagie (Obr.6) (Hofius et al., 2009). Důležitým inhibitorem bakteriálního růstu se v tomto případě zdá být cathepsin B. Zejména při interakci *N. Benthamiana* s *Phytophthora infestans*, je PCD zprostředkována cathepsinem B. Indukce PCD probíhá rozpoznáním efektorového genu *AvrR3a* příslušným receptorem *R3a* typu CC-NB-LRR z rodiny R-genů (Gilroy et al., 2007; Jupe et al., 2012). U modelu *A. thaliana* se rostliny ošetřené inhibitorem cathepsinu B projevují sníženou schopností iniciovat PCD v buňkách napadených patogenem nesoucím efektor *AvrRpm1*. Míra suprese PCD je srovnatelná s výsledky zjištěnými u rostlina mutantní v *atg7*, nicméně v případě ošetření *atg7* mutantu inhibitorem cathepsinu B rostlina vykazuje masivnější redukci PCD než předchozích dvou experimentech. Je tedy zřejmé, že imunitní odpověď odvíjející se od *RPM1* signalizace zahrnuje zapojení jak aktivity cathepsinu B,

tak i autofagických procesů, nicméně PCD indukovaná avirulentním genem *AvrRpt2* je na autofagii nezávislá (Aarts et al., 1998; Hofius et al., 2009). (Obr.6)



Obr. 6 Model typu PCD závislé na genech avirulence. *AvrRpm1* spouští jak PCD zahrnující autofagické procesy skrze EDS1, tak i PCD indukovanou NDR1. Převzato a upraveno z (Hofius et al., 2009)

3.2 Role autofagie v SA signalizační dráze

Kyselina salicylová (SA) je důležitou signalizační molekulou účastnící se klíčových procesů během boje s převážně biotrofními organismy. Nyní se ukazuje, že tato SA signalizační dráha je často ovlivňována autofagií. Důkazem toho je výzkum provedený na genetickém modelu *Arabidopsis thaliana* s mutací v genu *ATG5* nebo *ATG2* (Yoshimoto et al., 2009). Fenotyp takovéto mutace se projevuje násobně zvýšenou akumulací SA v buňce, která koreluje se stářím tkáně a v průběhu času narůstá. U nemutantních rostlin je množství SA za běžných podmínek konstantní a udržováno na nízké úrovni. Zvýšená akumulace SA je pro buňku toxická a spojená se zahájením senescence (Yoshimoto et al., 2009). Během SA signalizace je proto velmi důležitým proteinem *NPR1*, který se uplatňuje jako jeden z hlavních receptorů signálu zprostředkovaným SA. Funkce tohoto proteinu spočívá v aktivaci PR genů, spuštěním příslušné imunitní odpovědi a SAR

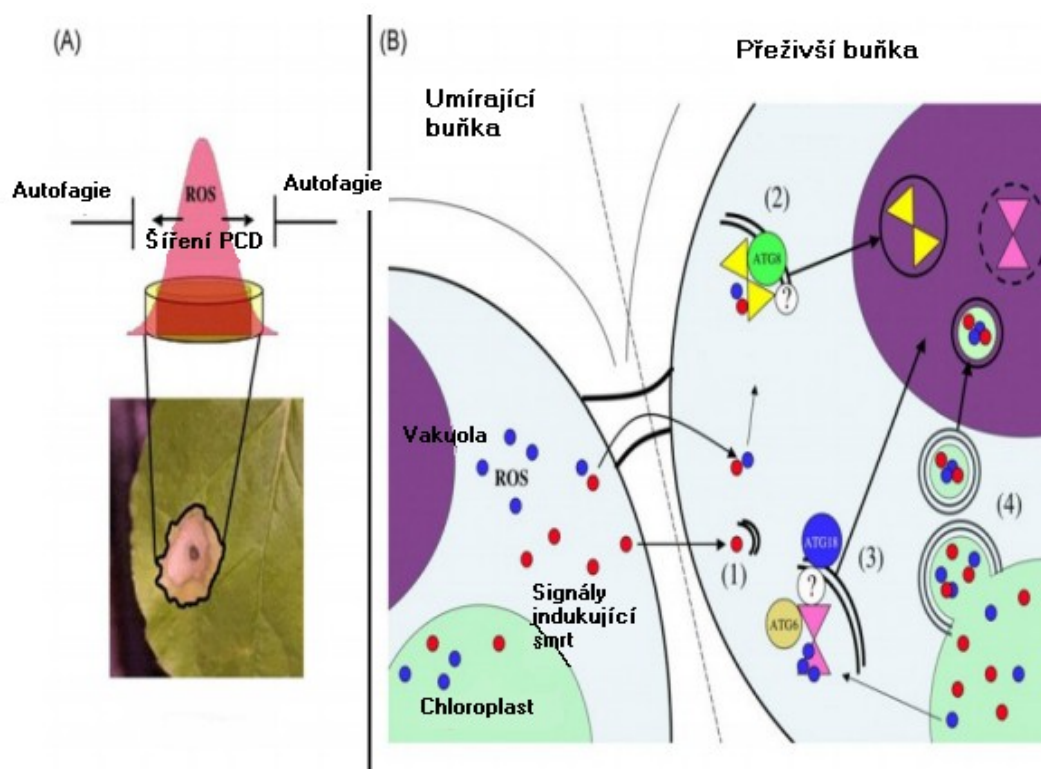
(Cao, et al., 1997). Tedy *atg2* nebo *atg5* mutantní rostliny se v průběhu života vyznačují zrychlenou senescencí v kontrastu k jedincům divokého-typu. Ovšem v případě, že jsou tyto mutanti donuceni exprimovat gen *NahG*, kódující hydroxylázu odstraňující SA, je efekt *atg2* a *atg5* mutací potlačen. Syntéza kyseliny salicylové je závislá na funkčnosti genu *SID2*, při zkřížení rostlin s defektem v genech *atg 2* či *atg5* s rostlinami *sid2* nebo *npr1* je díky nefunkční receptci či syntézy SA senescence potlačena rovněž (Yoshimoto et al., 2009). Infekce hojně užívaným patogenem *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 nesoucím *AvrRpm1* u rostlin s autofagickým defektem v důsledku mutace *atg5*, je provázena tvorbou nekrotických lézí vzniklých v důsledku nekontrolované HR odpovědi. To naznačuje, že autofagie je i v tomto případě důležitým faktorem pro restrikci PCD. Mechanismus restrikce je patrně spojen s omezením změn indukovaných SA, jelikož při inokulaci mutantního křížence *atg5* & *sid2* či *npr1* (defektní v SA signalizaci) stejným patogenem, nedochází k rozšiřování buněčné smrti. Je tedy zřejmé, že skutečně existuje přímá souvislost mezi SA a autofagií. Pokud je totiž pokusná rostlina typu divokého-type ošetřena syntetickým agonistou kyseliny salicylové, vykazuje tvorbu autofagosomálních struktur (Yoshimoto et al., 2009). Tento projev se ovšem u *atg5* a *atg2* jedinců nevyskytuje (Patel & Dinesh-Kumar, 2008).

Důležitou součástí SA signalizace jsou ROS tvořené během HR a jiných typů PCD. Mezi ROS ovšem nalezneme i molekuly, které samy o sobě mají funkci jako stresový posel. Typickým a dobře známým příkladem je NO, který je silně difuzního charakteru a je tedy schopen efektivně šířit příslušný signál napříč pletivem (Yoshimoto et al., 2009). Produkce ROS je naprosto běžná u všech organismů s aerobním metabolismem, hlavními producenty jsou mitochondrie, chloroplasty a peroxisomy. Dalším velmi významným tvůrcem ROS je NADPH oxidáza (Jasid et al., 2006). Jedná se o protein ukotvený v plasmatické membráně a vytváří ROS v důsledku abiotického i biotického stresu. Bylo prokázáno, že produkce ROS NADPH oxidázou je spojena s indukcí autofagie během mimo jiné oxidativního stresu (Yoshimoto et al., 2009). Přesný mechanismus dosud není bohužel znám. Nicméně jelikož je ROS jedním z iniciátorů syntézy SA a autofagie je v rostlině indukována aplikací SA agonistou (Liu et al. 2009), může být autofagie i v tomto případě spuštěna skrze SA signalizaci.

Chloroplasty pravděpodobně hrají také podstatnou roli v produkci ROS (Jasid et al., 2006). Navíc jsou chloroplasty odpovědné za syntézu SA, čehož využívají bakterie *Pseudomonas syringae* disponující efektem *HopI1*, který pozměňuje stavbu chloroplastu, ovlivňuje syntézu SA a tím potlačuje imunitní reakce (Jelenska et al., 2007). TMV virus kmene *flavum* rovněž napadá chloroplasty a následně způsobuje rozsáhlé odumírání chlorotického typu

v napadených pletivech U rostlin s mutací *atg5* nebo 2 se projevuje zvýšená akumulace ROS oproti divokého-typům (Freeman et al, 1985; Jelenska et al., 2007). Autofagie se rovněž podílí na degradaci oxidovaných proteinů poškozených v průběhu oxidativního stresu (Lehto et al., 2003).

Díky výsledkům těchto studií lze předpokládat, že autofagie může omezit šíření signalizace pro iniciaci PCD nejen na úrovni sekundárních posílů (například NO), ale dokonce i na úrovni degradace částí nebo i celých chloroplastů, případně i jiných organel (Yoshimoto et al., 2009). (Obr.7)



Obr. 7 (A) Model regulace signálu buněčné smrti během ETI. Autofagie zde působí jako negativní regulátor a zabraňuje šíření. **(B) Hypotetické schéma regulace signálů indukujících PCD.** Cílem pro degradační dráhu prostřednictvím autofagie, (1) by mohly být samotné signální molekuly z umírající buňky či (2) receptory schopné registrovat signální molekuly, (3) látky pozměněné v důsledku funkce ROS případně (4) zdroj signálu pro PCD (chloroplast). Převzato (Hayward et al., 2009).

Zcela novým objevem je spojení mezi enzymem glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázou (GADPH) a autofagií (Han et al., 2015; Henry et al., 2015). Tento enzym je obecně znám z glykolýzy, kde oxiduje glyceraldehyd-3-fosfát. Rostlina disponuje velkým množstvím různých isoformů tohoto enzymu a GADPH mohou být lokalizovány jak v cytoplasmě, tak v plastidech (Zaffagnini et al., 2013). GADPH se kromě glykolýzy uplatňuje i během redukce ROS (Henry et al., 2015), které jsou běžně vytvářeny metabolismem v průběhu například fotosyntézy a elektron transportního řetězce. ROS jsou důležitými faktory v boji proti patogenům a tedy cíleným vypnutím GADPH se zvyšuje množství ROS v buňce a tím se spustí varovná signální dráha spojená s SA.

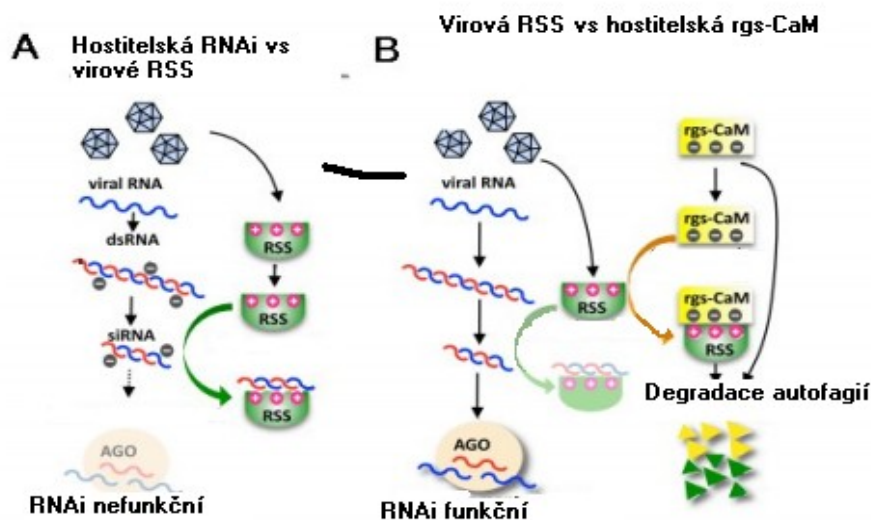
Ukazatelem tohoto signálního procesu bývá exprese genu PR1 (Durrant & Dong, 2004) (Obr.3). V rostlinách s defektem tvorby GAPDH je přepis PR1 vyšší, rostlina se tedy projevuje zvýšenou rezistencí převážně proti biotrofním patogenům (Han et al., 2015; Henry et al., 2015). V interakci *N. Benthamiana* s vypnutým GAPDH s TMV virem, mutaní jedinci vykazují vyšší rezistenci a množství viru v takto mutantních buňkách je mnohokrát nižší než u rostlin divokého-typu (Han et al., 2015). Dalším průvodním jevem umlčení GAPDH u rostlin je zvýšená tvorba autofagosomálních struktur při umělém vyvolání oxidativního stresu oproti nemutantním rostlinám (Han et al., 2015; Henry et al., 2015). GADPH tedy přímo souvisí s iniciací autofagie a potažmo se signální dráhou závislou na ROS/SA.

3.2.1 Role autofagie během RNA-interference způsobené virovou infekcí

Viry stojí na pomezí mezi živými organismy a neživou parazitickou genetickou informací. Obrana proti virům se odlišuje od ostatních patogenů. Počáteční fáze je *de facto* totožná s ostatními parazitickými organismy, viry mají své MAMPs a efektorové proteiny (oproti bakteriím ovšem v menší míře) (Xiong et al., 2007). Virus potřebuje pouze hostitelův replikační a translační aparát, čímž se zásadně liší od např. hub nebo bakterií, které z hostitele získávají živiny. Nicméně rostliny disponují obraným mechanismem známým jako RNA-silencing (Agius et al. 2012, review). Jedná se o složitý mechanismus, při kterém dochází k cílenému rozstříhání virové dsRNA na malé fragmenty (siRNA) a umlčení virového transkriptu (Agius et al. 2012, review) (Obr.8). Sestřih se odehrává v komplexu RISC, jehož jednou z hlavních součástí je protein ARGONAUTE1 (AGO1) (Agius et al. 2012, review) (Obr.8). Viry se proti tomuto procesu brání expresí speciálních proteinů potlačujících RNA-silencing (RSS). A naopak rostlina může disponovat receptory

schopnými tyto RSS rozpoznat (Nakahara et al. 2012). V posledních letech byla objevena spojitost mezi RSS a autofagií, jedním z receptorů RSS je rgs-CaM (calmodulin like-protein tabáku), který se váže na RSS protein HC-Pro (či Y2b. Specifickým barvením pomocí Lysotrackeru, bylo zjištěno, že komplex rgs-CaM & Y2b je degradován v autolysosomu (Nakahara et al. 2012). Jiný virový RSS P0 dokáže zamezit RNA interferenci odstraněním AGO1 pomocí autofagie, kterou v hostiteli cíleně vyvolá ubiquitinací AGO1 (Nakahara et al., 2012) Autofagie tedy hraje důležitou roli i během virové nákazy, může být zapojena jak do braného procesu, kdy zamezuje virovým RSS efektivně pracovat, nebo může být využita virovým patogenem proti hostiteli.

Obr. 8 Schéma umlčení virové RNA. (A) Úspěšné potlačení obrany virovým RSS, kde siRNA, kterou by jinak převzal AGO, naváže RSS a virus může pokračovat v životním cyklu. (B) Rostlinný receptor rgs-CaM interaguje s virovým RSS, tento komplex je následně degradován prostřednictvím autofagického procesu (Nakahara et al., 2012) Převzato a upraveno z (Nakahara et al., 2012)



3.3 Autogíe v obraně před nekrotrofními organismy

Efektivně odpovědět na infekci nekrotrofním patogenem, vyžaduje od rostlinného metabolismu aktivaci široké řady imunitních procesů. *WRKY33* a *ATG18a* jsou geny účastníci se v imunitní reakci proti nekrotrofnímu organismu *Botrytis cinerea* (Lai et al., 2011). *WRKY33* je transkripční faktor úzce spolupracující s MAP kinázou 4 (MAPK4), interakce těchto dvou proteinů je stěžejní při syntéze camalexinu (PAD3) (Obr.3) (Lai et al. 2011). Camalexin je poměrně

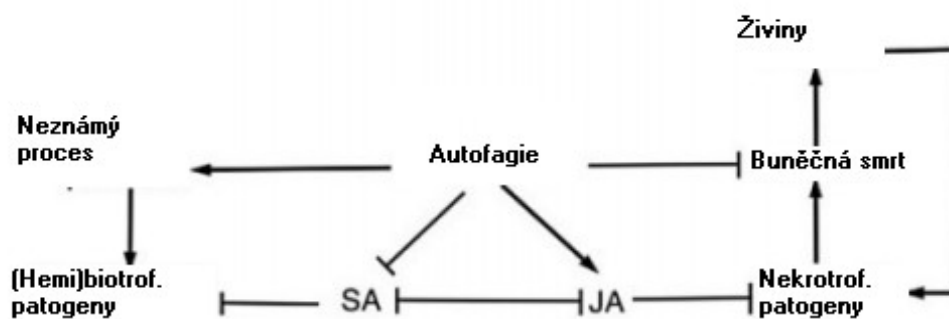
široko-spektrální rostlinný fytoalexin (Rogers et al., 1996) schopný efektivně rozrušovat buněčné membrány, který se intenzivně podílí na rezistenci vůči nekrotrofním patogenům jako je *Botrytis cinerea* (Lai et al., 2011). Nicméně úloha interakcí faktoru WRKY33, se zdá být ještě o mnoho komplikovanější, a zapojena do indukce autofagických procesů. Kromě MAPK4 spolupracuje s výše zmiňovaným genem *ATG18a* (Andreasson et al., 2005; Zheng et al., 2006). Aktivace autofagických procesů přímo souvisí s funkcí WRKY33, jedinci *wrky33* nesoucí mutaci v tomto genu, vykazují rychlé snížení transkripce genu *ATG18a* během infekce houbovým parazitem *Botrytis cinerea* (Zheng et al., 2006). Chování těchto mutantů je přesným opakem projevu u kontrolních rostlin, kde množství transkriptu pro *ATG18a* vzrůstá. Stejný se projevují i geny *ATG5*, *ATG6*, *ATG7*, *ATG8a*, *ATG9* a *ATG10*, jejich přepis je umocněn v důsledku inokulace *Botrytis cinerea* (Lai et al., 2011). Lze tedy předpokládat, že autofagie je nedílnou součástí procesů aktivovaných při boji s nekrotrofními patogeny. Toto tvrzení podporuje i fakt, že rezistence vůči *Botrytis cinerea* je razantně potlačena u *wrky33* a *atg18a* pokusných rostlin (Lai et al., 2011). Fenotypovým projevem během nákazy způsobené tímto patogenem je u kontrolních jedinců tvorba malých ostrůvků nekrotické tkáně (lézí) vázaných na místa infekce, zatímco u mutantů *wrky33* či *atg18a* se omezení buněčné smrti neprojevuje a patogen je schopen se šířit přes celé listy. Léze vznikají jak u mutantů, tak divokého-typů vylučováním toxinů a látek ovlivňující metabolismus hostitele (Lai et al., 2011).

Vskutku strhující poznatky prokazující klíčovou roli autofagie v boji proti nekrotrofním patogenům, přinesla nedávno provedená studie (Kabbage et al., 2013). Nekrotrofní patogen *Sclerotinia sclerotiorum* dokáže aktivně syntetizovat kyselinu šťavelovou, která je v tomto případě schopna velmi efektivně indukovat v hostiteli PCD, prostřednictvím ROS (Williamson et al., 2007). Díky tomuto faktoru, je *S. sclerotiorum* velice virulentním patogenem u mnoha hostitelských druhů. Ovšem pokud je *S. sclerotiorum* zamezena produkce kys. šťavelové (patogen s tímto defektem byl nazván A2), dokáže hostitel nákaze bez problémů odolat (Kabbage et al., 2013). Inokulace *A. thaliana* nepatogenním typem A2 iniciuje v buňce tvorbu autofagosomálních struktur a růst patogenu je zastaven v důsledku spuštění imunitní reakce skrze PDF1.2 a HR. Ošetření rostlin divokým-typem patogenu není provázeno formací autofagosomů a dochází k masivní nekróze napadených tkání (Kabbage et al., 2013). Kyselina šťavelová tedy patrně ovlivňuje funkci autofagie, jelikož rostliny s autofagickým defektem *atg8* nebo *atg7*, nejsou schopny vybudovat rezistenci vůči jinak nepatogennímu kmenu A2 (Kabbage et al., 2013). To opět svědčí o nezastupitelné roli autofagie v obrně před nekrotrofními patogeny.

3.4 Role autofagie v koordinaci SA a JA/ET signalizačních drah

Během imunitních reakcí namířených proti nekrotrofním patogenům se mimo jiné ve velké míře exprimuje gen *PDF1.2*. Aktivaci tohoto genu zprostředkovává signalizační dráha závislá na JA a ET (Obr.3). Exprese *PDF1.2* je za běžných podmínek na velmi nízké úrovni. Během infekce *Botrytis cinerea* se u divokého-type rostlin zvyšuje exprese toho genu, avšak u rostlin s autofagickým defektem se naopak projevuje rapidní snížení (Lai et al., 2011). Nicméně *Botrytis cinerea* indukuje v hostiteli HR, to je následováno signální kaskádou spojenou s SA a zahájením transkripce genu *PR1*. Rostliny s *atg* mutacemi obecně vykazují vyšší množství SA ve svých buňkách. Jelikož jsou dráhy pro aktivaci *PR1* a *PDF1.2* v tomto případě antagonistické, mohlo by se zdát, že pokles *PDF1.2* u *atg* rostlin patrně způsoben akumulací SA. Ve skutečnosti tak tomu ovšem není. Inokulace hostitele s dvojitou mutací *atg5-1 a sid2*, s fenotypem známým ze studie (Yoshimoto et al., 2009), stejným patogenem, vykazuje opět snížení exprese *PDF1.2* (ačkoliv je defektní v syntéze SA). Tento experiment tedy dokazuje, že redukce *PDF1.2* u *atg* jedinců není indukována akumulací SA (Lai et al., 2011). Nicméně kolísání množství *PDF1.2* v u rostlin schopných autofagie v důsledku infekce *Botrytis cinerea*, je silným důkazem významu autofagických procesů během specifikace imunitní odpovědi. Je patrně důležitým faktorem koordinace signalizace SA proti JA & ET dependentní signální dráhy (Lai et al., 2011; Yoshimoto et al., 2009; Zhou et al., 2014) (Obr.9).

Obr 9 Hypotetické schéma úlohy autofagie v signalizaci JA a SA. Kde autofagie negativně reguluje dráhu SA, která je spojená s biotrofním typem imunity. A tím pozitivně reguluje dráhu JA, signalizující spíše procesy pro restrikci buněčné smrti. Převzato z (Zhou et al., 2014)



4. Závěr

Výsledky zde zmiňovaných výzkumů prokazují, že funkce autofagie je nezbytným faktorem pro efektivní průběh imunitních reakcí u rostlin. Rostlina disponuje rozličnými obrannými mechanismy jak se bránit proti infekci, avšak v mnoha případech musí být kontrolovány autofagickými procesy. Takovýmto příkladem může být restrikce signálu pro indukci PCD během HR, kde se autofagie patrně účastní degradace jak signálních molekul, tak celých organel produkujících tyto signály. Stěžejní roli hraje též během signalizace závislé na JA a ET. Zde se autofagie podílí na koordinaci a restrikci SA proti JA/ET signálů v závislosti na druhu patogenu (zda je biotrofního či nekrotrofního charakteru), který rostlinu napadl. Některé viry dokonce využívají autofagii ve svůj prospěch a obracejí ji proti samotnému hostiteli. Indukce autofagie je velice komplikovaný proces a autofagie může mít jak funkci zajišťující přežití buňky, tak funkci smrtící, přičemž zahájení příslušné specifické reakce se odvíjí od složitých interakcí mezi hostitelem a patogenem. Na funkci autofagie má vliv také stáří či fyziologický stav rostliny. Mnohé z těchto regulačních drah nejsou však doposud kompletně odhaleny a je jisté, že některé stále čekají na své objevení. Autofagie společně s imunitním systémem rostlin jsou aktuálně intenzivně zkoumaným tématem a neustále se objevují nové informace svědčící o provázanosti jednotlivých procesů buňce. Jelikož souboj mezi hostitelem a patogenem nemá konce, je důležité rozšiřovat poznání. Důkladný průzkum této problematiky může v budoucnu umožnit uměle aktivovat imunitní systém rostlin a pomoci tak při ochraně plodin před patogenní nákazou přirozenou cestou. Je dobré si uvědomit, jak velký podíl naší stravy tvoří produkty rostlin a že každá nová informace může v budoucnu znamenat skutečně mnoho. Zvláště ve vztahu k možnostem bezpečného a dlouhodobého uskladnění plodin bez ztrát způsobených patogenními bakteriemi, viry i houbami, které doposud způsobují obrovské ztráty v zemědělství.

Seznam použité literatury

* označuje citace převzaté z review

- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B. J., Daniels, M. J., & Parker, J. E. (1998). Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 10306–10311.
- Agius, C., Eamens, A. L., Millar, A. A., Watson, J. M., & Wang, M. B. (2012a). RNA silencing and antiviral defense in plants. *Methods in Molecular Biology*, 894, 17–38. *
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N. H. T., Zhu, S., Mundy, J. (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO Journal*, 24(14), 2579–89.
- Bohman, S., Staal, J., Thomma, B. P. H. J., Wang, M., & Dixelius, C. (2004). Characterisation of an Arabidopsis-Leptosphaeria maculans pathosystem: Resistance partially requires camalexin biosynthesis and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant Journal*, 37(1), 9–20.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S., & Dong, X. (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88(1), 57–63.
- Century, K. S., Holub, E. B., & Staskawicz, B. J. (1995). NDR1, a locus of Arabidopsis thaliana that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(July), 6597–6601.
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), 826–833. *
- Derrien, B., Baumberger, N., Schepetilnikov, M., Viotti, C., De Cillia, J., Ziegler-Graff, V., Genschik, P. (2012). Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 15942–15946.
- Doke, N., & Ohashi, Y. (1988). Involvement of an O₂- generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 32(1), 163–175.
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Phytopathology*, 185–209. *
- Ellis, C., Ellis, C., Karafyllidis, I., Karafyllidis, I., Wasternack, C., Wasternack, C., Turner, J. G.

- (2002). The Arabidopsis Mutant. *Society*, 14(July), 1557–1566.
- Ferrari, S., Plotnikova, J. M., De Lorenzo, G., & Ausubel, F. M. (2003). Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant Journal*, 35(2), 193–205.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept, 275–296.
- Freeman, T. P., Duysen, M. E., & Gulya, T. J. (1985). Ultrastructural Changes in Sunflower Chloroplasts Following Inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*. *American Journal of Botany*, 72(5), 707–714.
- Gilroy, E. M., Hein, I., Van Der Hoorn, R., Boevink, P. C., Venter, E., McLellan, H., Birch, P. R. J. (2007). Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response. *Plant Journal*, 52(1), 1–13.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205–227. *
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H. S., Nawrath, C., Métraux, J. P., Katagiri, F. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant Journal*, 34(2), 217–228.
- Glazebrook, J., Rogers, E. E., & Ausubel, F. M. (1997). Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review of Genetics*, 31, 547–569.
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10(13), 751–757.
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2002). Infection of Arabidopsis with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant Molecular Biology*, 48(3), 267–276.
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8(10), 1773–1791.*
- Han, S., Wang, Y., Zheng, X., Jia, Q., Zhao, J., Bai, F., Liu, Y. (2015). Cytoplasmic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases Interact with ATG3 to Negatively Regulate Autophagy and Immunity in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell*, 27(April), 1316–1331.
- Hayward, A. P., Tsao, J., & Dinesh-Kumar, S. P. (2009). Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(9), 1041–1047. *
- Henry, E., Fung, N., Liu, J., Drakakaki, G., & Coaker, G. (2015). Beyond glycolysis: GAPDHs are multi-functional enzymes involved in regulation of ROS, autophagy, and plant immune responses. *PLoS Genetics*, 11(4), e1005199.
- Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D. I., Petersen, N. H. T., Mattsson, O., Petersen, M. (2009). Autophagic Components Contribute to Hypersensitive Cell Death in

Arabidopsis. *Cell*, 137(4), 773–783.

- Jasid, S., Simontacchi, M., Bartoli, C. G., & Puntarulo, S. (2006). Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology*, 142(3), 1246–1255
- Jelenska, J., Yao, N., Vinatzer, B. A., Wright, C. M., Brodsky, J. L., & Greenberg, J. T. (2007). A J Domain Virulence Effector of *Pseudomonas syringae* Remodels Host Chloroplasts and Suppresses Defenses. *Current Biology*, 17(6), 499–508.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. *
- Jupe, F., Pritchard, L., Etherington, G. J., MacKenzie, K., Cock, P. J., Wright, F., Hein, I. (2012). Identification and localisation of the NB-LRR gene family within the potato genome. *BMC Genomics*, 13(1), 75.
- Kabbage, M., Williams, B., & Dickman, M. B. (2013). Cell Death Control: The Interplay of Apoptosis and Autophagy in the Pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS Pathogens*, 9(4).
- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Silva, H. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8849–8855.
- Lai, Z., Wang, F., Zheng, Z., Fan, B., & Chen, Z. (2011). A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 66(6), 953–968.
- Lehto, K., Tikkanen, M., Hiriart, J.-B., Paakkanen, V., & Aro, E.-M. (2003). Depletion of the photosystem II core complex in mature tobacco leaves infected by the flavum strain of tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 16(12), 1135–44.
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallóczy, Z., Levine, B., & Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121(4), 567–577.
- Liu, Y., Xiong, Y., & Bassham, D. C. (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*, 5(7), 954–963.
- Nakahara, K. S., Masuta, C., Yamada, S., Shimura, H., Kashihara, Y., Wada, T. S., Uyeda, I. (2012). Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(25), 10113–8.
- Parker, J. E., Holub, E. B., Frost, L. N., Falk, A., Gunn, N. D., & Daniels, M. J. (1996). Characterization of eds1, a mutation in Arabidopsis suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *The Plant Cell*, 8(11), 2033–46.
- Patel, S., & Dinesh-Kumar, S. P. (2008). Arabidopsis ATG6 is required to limit the pathogen-

associated cell death response. *Autophagy*, 4(1), 20–27.

- Penninckx, I. a, Thomma, B. P., Buchala, a, Métraux, J. P., & Broekaert, W. F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(12), 2103–2113.
- Rogers, E. E., Glazebrook, J., & Ausubel, F. M. (1996). Mode of action of the Arabidopsis thaliana phytoalexin camalexin and its role in Arabidopsis-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*.
- Seay, M., Hayward, A. P., Tsao, J., & Dinesh-Kumar, S. P. (2009). Something old, something new: Plant innate immunity and autophagy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 335(1), 287–306.*
- Tanida, I. (2011). Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(11), 2201–2214.*
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., & Broekaert, W. F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(December), 15107–15111.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Ryals ', J. (1992). Acquired Resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell American Society of Plant Physiologists*, 4(June), 645–656.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. L. (2007). Botrytis cinerea: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561–580.
- Xiong, Y., Contento, A. L., Nguyen, P. Q., & Bassham, D. C. (2007). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 143(1), 291–299.
- Yalpani, N. (1991). Salicylic Acid Is a Systemic Signal and an Inducer of Pathogenesis-Related Proteins in Virus-Infected Tobacco. *The Plant Cell Online*, 3(8), 809–818.
- Yang, X., & Bassham, D. C. (2015). *New Insight into the Mechanism and Function of Autophagy in Plant Cells. International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 320). Elsevier Ltd.
- Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Shirasu, K. (2009). Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(9), 2914–27.
- Zheng, Z., Qamar, S. A., Chen, Z., & Mengiste, T. (2006). Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant Journal*, 48(4), 592–605.

- Zaffagnini M, Fermani S, Costa A, Lemaire SD, Trost P (2013) Plant cytoplasmic GAPDH: redox posttranslational modifications and moonlighting properties. *Front Plant Sci* 4: 450.
- Zhou, J., Yu, J. Q., & Chen, Z. (2014). The perplexing role of autophagy in plant innate immune responses. *Molecular Plant Pathology*, 15(6), 637–645. *